



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

«مدیریت پژوهشی»

عنوان طرح پژوهشی:

« بررسی تاثیر مهار mir29a بر بیان ژنهای HSP در سلولهای لاین سرطان

پستان MCF7 »

مجری طرح :

غلامرضاخمیسی پور-بهروزنعیمی

همکاران طرح :

ایرج نبی پور-انسیه چغایی-شکیب شمسیان

سال ۹۳-۱۳۹۲

مقدمه:

این تحقیق حاصل بیش از ۱۶ ماه تلاش مستمر می باشد و اولین پژوهش در سطح نانو با تکیه بر **microRNA** و **siRNA** در استان بوشهر می باشد و عمده زمان صرف شده بخاطر راه اندازی و آماده سازی بخش های کشت سلول های بنیادی و مولکولی بوده است.

باسپاس بسیار از استاد بزرگوار جناب دکتر ایرج نبی پورو همکاری صمیمانه کارکنان پژوهشکده زیست پزشکی خلیج فارس دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

و

سپاس از همکاری های علمی دانشگاه آزاد اسلامی تهران
واحد علوم دارویی

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
خلاصه فارسی	۴
مقدمه.....	۸-۷
فصل اول : کلیات	
سرطان و مکانیسم سلولی و ملکولی آن.....	۱۲-۱۰
۱-۱- تغییرات سلولی سرطان.....	۱۳-۱۶
۱-۲-۱- سلولهای بنیادی سرطان (CSCs).....	۱۷-۱۸
۲-۱- تغییرات ملکولی سرطان و بیان ژن.....	۱۹
۱-۳-۱- microRNA در سرطان.....	۲۰-۲۴
۲-۳-۱- مولکول پروتئین شوک حرارتی (HSP) و سرطان.....	۲۵-۲۷
۳-۱- سرطان پستان.....	۲۹
۱-۴-۱- آناتومی پستان.....	۳۰
۲-۴-۱- گسترش سرطان پستان.....	۳۱
۳-۴-۱- مراحل سرطان پستان.....	۳۶-۳۲
۴-۴-۱- بررسی سلولی ملکولی سرطان پستان.....	۳۹-۳۷
۵-۴-۱- تشخیص سرطان پستان.....	۴۰
۶-۴-۱- مارکرها در سرطان پستان.....	۴۱
۷-۴-۱- درمان سرطان پستان	۴۲-۴۱

فصل دوم : مروری بر متون گذشته

فصل سوم : مواد و روش

۱-۳- نوع

پژوهش..... ۵۲

۲-۳- سلول های مورد

مطالعه..... ۵۲

۳-۳- ژن های مورد بررسی..... ۵۳

۴-۳- دارو و شبه داروی مصرفی در این تحقیق..... ۵۴

۵۵.....	۳-۵- ذوب کردن سلول های لاین سرطان پستان MCF-7
۵۶.....	۳-۶- کشت و تکثیر سلولهای MCF-7 در محیط RPMI۱۶۴۰
۵۷.....	۳-۷- جدا کردن سلول های تکثیر یافته MCF-7 و انتقال به پلیت 96 خانه
۵۸.....	۳-۸- تعیین درصد سلول های زنده
۶۱-۵۹.....	۳-۹- ترانس فکشن Transfection
۶۲.....	۳-۱۰- استخراج RNA
۶۳.....	۳-۱۱- بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده
۶۳.....	۳-۱۱-۱- روش کمی توسط نانودراپ
۶۴.....	۳-۱۱-۲- روش کیفی توسط الکتروفورز
۶۵.....	۳-۱۲- سنتز cDNA از RNA های استخراج شده
۶۵-۶۶.....	۳-۱۲-۱- سنتز cDNA با پرایمر اختصاصی به روش Stem loop RT PCR
۶۷.....	۳-۱۲-۲- سنتز cDNA با پرایمر عمومی
	۳-۱۳- تکنیک Real time PCR
۶۸.....	۳-۱۳-۱- مفهوم Real time PCR
۶۸.....	۳-۱۳-۲- روش سنجش با Real time PCR
۶۹.....	۳-۱۳-۳- روش تعیین کمیت با Quantitative real – time PCR
۷۰.....	۳-۱۳-۴- پرایمرهای مربوط به ژنهای هدف و مرجع
	۳-۱۳-۵- تهیه Master mix در واکنش Realtime PCR برای mir- 29a و U6
۷۱.....	snRNA
	۳-۱۳-۶- تهیه Master mix در واکنش Realtime PCR برای ژن های HSP و HPRT
۷۳-۷۲.....	
	فصل چهارم : نتایج
۷۶-۷۵.....	۴-۱- نمودار Ct و منحنی ذوب ژن miR-29a
۷۷.....	۴-۲- محاسبه بیان ژن miR-29a
۷۹-۷۸.....	۴-۳- نمودار Ct و منحنی ذوب ژن HSP90
۸۱-۸۰.....	۴-۴- محاسبه بیان ژن HSP90
۸۳-۸۲.....	۴-۵- نمودار Ct و منحنی ذوب ژن HSP70
۸۵-۸۴.....	۴-۶- محاسبه بیان ژن HSP70
۸۷-۸۶.....	۴-۷- نمودار Ct و منحنی ذوب ژن HSP60
۸۸.....	۴-۸- محاسبه بیان ژن HSP60

فصل پنجم : بحث و پیشنهادات

۵-۱- بحث.....	۹۱
۵-۱-۱- تغییرات بیان miR-29a.....	۹۱
۵-۱-۲- تغییرات بیان HSP90.....	۹۱-۹۲
۵-۱-۳- تغییرات بیان HSP70.....	۹۳
۵-۱-۱- تغییرات بیان HSP60.....	۹۴
۵-۲- نتیجه گیری نهایی.....	۹۵
۵-۳- پیشنهادات.....	۹۶
منابع.....	۹۸-۱۱۷
خلاصه	
انگلیسی.....	

۱۲۴

فهرست جداول

جدول ۱-۱ - مقایسه تومور خوش خیم و بدخیم	
جدول ۲-۱ - آنزیمهای بیوسنتز miRNA	
جدول ۳-۱ - میزان شیوع ابتلا به سرطان پستان در گروه های مختلف سنی در زنان	
جدول ۲ - ۱ - مقایسه در دو بافت سرطانی و غیر سرطانی	
جدول ۳-۱ - ویژگی های سلولهای MCF - 7	
جدول ۳-۲ - ساخت Master mix برای ترانس فکشن	
جدول ۳-۳ - معرفی گروه های مورد مطالعه ومحتویات آنها برحسب میکرولیتر	
جدول ۳-۴ - مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای سنتز cDNA	
جدول ۳-۵ - تهیه Master mix برای سنتز cDNA با پرایمر اختصاصی mir 29a و U6 snRNA	
جدول ۳-۶ - برنامه دمایی سنتز cDNA با پرایمر اختصاصی	
جدول ۳-۷ - برنامه دمایی سنتز cDNA با پرایمر عمومی	
جدول ۳-۸ - مشخصات پرایمرهای استفاده شده در Realtime	
جدول ۳-۹ - مواد مصرفی در مخلوط Realtime PCR برای miR-29a و U6 snRNA	
جدول ۳-۱۰ - برنامه حرارتی Realtime PCR برای miR-29a و U6 snRNA .	
جدول ۳-۱۱ - مواد مصرفی در مخلوط Realtime PCR برای ژن های HSP و HPRT	

جدول ۳-۱۲- برنامه حرارتی Realtime PCR برای ژن های HSP و HPRT
جدول ۴-۱- مقادیر Ct ژن miR-29a و U6 snRNA
جدول ۴-۲- نسبت تغییرات بیان ژن mir-29a در گروه های تیمار شده به کالیبراتور با روش فافل

جدول ۴-۳- مقادیر Ct ژن HSP90 و HPRT
جدول ۴-۴- نسبت تغییرات بیان ژن HSP90 در گروه های تیمار شده به کالیبراتور با روش فافل

جدول ۴-۵- مقادیر Ct ژن HSP70 و HPRT
جدول ۴-۶- نسبت تغییرات بیان ژن HSP70 در گروه های تیمار شده به کنترل با روش فافل

جدول ۴-۷- مقادیر Ct ژن HSP60 و HPRT
جدول ۴-۸- نسبت تغییرات بیان ژن HSP60 در گروه های تیمار شده به کنترل با روش فافل

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱- مقایسه سلول های سالم و سرطانی
شکل ۱-۲- انتقال اپیتلیال -مزانشیمال و کاهش بیان کادهترین
شکل ۱-۳- متاستاز در کارسینومای پستان
شکل ۱-۴- منشا های احتمالی ایجاد سلول های بنیادی سرطانی
شکل ۱-۵ - بیوسنتز و فعالیت microRNA
شکل ۱-۶ - قسمتهای تشکیل دهنده ی غدد پستانی سرطانی
شکل ۱-۷ - مراحل چهار گانه سرطان پستان

شکل ۳-۱- تصویر الکتروفورز total RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۲٪

فهرست نمودارها

- نمودار ۴-۱- نمودار Ct واکنشهای مربوط به گروه های کالیبراتور و تیمار شده
نمودار ۴-۲- نمودار منحنی ذوب برای گروه های کالیبراتور و تیمار شد
نمودار ۴-۳ نمودار ستونی نسبت تغییرات بیان ژن mir-29a در گروه های تیمار شده به کالیبراتور
نمودار ۴-۴ نمودار Ct واکنشهای مربوط به گروه های کالیبراتور و تیمار شده
نمودار ۴-۵ نمودار منحنی ذوب برای گروه های کنترل و تیمار شده
نمودار ۴-۶ نمودار ستونی نسبت تغییرات بیان HSP90 پس از تیمار با Anti mir-Scramble، 29a و Taxol
نمودار ۴-۷ نمودار Ct واکنشهای مربوط به گروه های کالیبراتور و تیمار شده

نمودار ۴-۸ نمودار منحنی ذوب برای گروههای کالیبراتور و تیمار شده
نمودار ۴-۹ نمودار ستونی تغییرات بیان HSP70 پس از تیمار با Anti mir-29a, Scramble و
Taxol
نمودار ۴-۱۰ نمودار Ct واکنشهای مربوط به گروه های کالیبراتور و تیمار شده
نمودار ۴-۱۱ نمودار منحنی ذوب برای گروههای کنترل و تیمار شده
نمودار ۴-۱۲ نمودار ستونی تغییرات بیان HSP60 پس از تیمار با Anti mir-29a, Scramble و
Taxol

خلاصه فارسی و انگلیسی :

اهداف: سرطان پستان از شایع ترین سرطانهای زنان در جهان محسوب می شود. مطالعات اخیر افزایش MicroRNA-29a در سرم بیماران مبتلا به سرطان پستان را نشان داده که گویای نقش آن در پاتوژنز این بیماری است. MicroRNA ها در فرایندهایی مثل تکثیر و آپوپتوز نیز نقش دارند. همچنین پروتئینهای شوک حرارتی که در پاسخ به استرس ایجاد می شوند نیز تنظیم کننده ی آپوپتوز می باشند. بطوریکه HSP60 پروآپوپتوتیک اما HSP70 و HSP90 آنتی آپوپتوتیک می باشند. هدف ما در این مطالعه بررسی اثر مهار microRNA-29a بوسیله anti-microRNA-29a، روی بیان HSP60، HSP70 و HSP90 در سلولهای لاین سرطان پستان MCF-7 می باشد.

روش کار: سلولهای MCF-7 در محیط RPMI1640 با FBS ۱۰٪ کشت داده شدند. گروههای مورد مطالعه شامل (شاهد و تیمار شده با Scramble، Anti mir-29a، Anti mir-29a + Taxol، Taxol) که پس از استخراج total RNA و سنتز cDNA، تغییرات بیان HSP60، HSP70 و HSP90 توسط RT PCR بررسی شدند.

نتایج: یافته ها نشان داد مهار microRNA-29a منجر به کاهش بیان HSP70، HSP90 و افزایش بیان HSP60 شد. بنابراین با توجه به نقش HSP ها در آپوپتوز با مهار microRNA-29a می توان آپوپتوز را گسترش داد.

نتیجه گیری نهایی: نتایج ما نشان داد می توان از مهارکننده های microRNA-29a بعنوان داروی جایگزین تاکسول با اثرات مشابه و عوارض موقتی و کمتر استفاده نمود.

کلید واژه: سرطان پستان، microRNA-29a، پروتئینهای شوک حرارتی، آپوپتوز

The surveying inhibitory effect of anti- micro RNA -29a on expression of heat shock proteins genes in breast cancer cell line MCF-7

Introduction: Recent studies have shown increase of microRNA-29a (miR-29a) in the serum of breast cancer patients which indicate the MicroRNAs play role in processes such as proliferation and apoptosis. Also heat shock proteins (HSPs) are generated in response to stress. HSPs are regulators of apoptosis. HSP60 is pro-apoptotic but HSP70 and HSP90 are anti-apoptotic. In this study we attempted to investigate the effect of downregulation of miR-29a by anti-microRNA-29a inhibitor on expression of HSP60, HSP70 and HSP90 genes in breast cancer cell line MCF-7.

Methods: Groups studied MCF-7 cells were cultured in RPMI-1640 medium with 10% FBS Including (control and treated with scramble, anti-mir-29a, anti-mir-29a+ Taxol, Taxol). After total RNA extraction and cDNA synthesis, the expression changes of HSP60, HSP70 and HSP90 were evaluated by real-time PCR.

Results: These findings demonstrate that inhibition of miR-29a by anti-miR-29a lead to upregulation of HSP60 and downregulation of HSP70 and HSP90. So with regard to role of HSPs in apoptosis, inhibition of miR-29a can promote apoptosis.

Conclusion : Our results showed that inhibitors microRNA-29a can be used as an alternative drug Taxol with Similar effects and temporary side and less

Key words: Breast cancer, miR-29a, HSPs, Apoptosis

مقدمه :

سرطان در نتیجه تقسیم غیرقابل کنترل سلولها بوجود می آید که ناشی از اختلالات ژنتیکی و عوامل محیطی است. چهار دسته از ژن های کلیدی که در هدایت سلول های سرطانی نقش دارند شامل آنکوژنها، ژن های مهار کننده توموری، ژن های ترمیم کننده DNA و ژن های مرگ برنامه ریزی شده^۱ هستند. عوامل محیطی موثر در سرطان نیز شامل ۳۰٪ دود سیگار، ۳۵٪ رژیم غذایی، ۲۵٪ بیماری های عفونی و ۱۰٪ مربوط به اشعه های یونی و غیر یونی می باشد. سرطان توسط یک سری جهش های متوالی در ژنها رخ می دهد [۲۰ و ۲۱].

سرطان پستان نیز یک بیماری متأثر از ژنتیک و یکی از شایعترین سرطانها در زنان محسوب می شود. علت این بیماری هنوز ناشناخته است اما میزان آن در صورت بروز برخی جهش های خاص، افزایش می یابد. جهش هایی که در برگیرنده طیف گسترده ای از تغییرات در ساختار و بیان ژن می باشد. BRCA1 و BRCA2 دو ژن شناخته شده ای هستند که موتاسیون آنها در تولید و رشد سلولهای سرطان پستان نقش موثری دارد.

ژن BRCA1 بر روی کروموزوم 17q21 قرار دارد. این ژن پروتئینی می سازد که چندین خاصیت دارد که یکی از این خواص قدرت تصحیح ژن های معیوب است. همچنین شکستگی های دو رشته DNA را ترمیم نمایند. ژن BRCA-2 هم که روی کروموزوم 13q14 می باشد پروتئینی می سازد که همانند پروتئین BRCA-1 عمل می کند. تشخیص جهش ژنی در سرطان پستان از طریق آزمایش خون انجام می گیرد. ولی با این وجود این تست های تشخیصی قادر نیستند به وضوح نشان دهند که آیا سرطان پستان در فرد ایجاد خواهد شد یا نه. اما افرادی که دارای این جهش ژنی هستند، بین ۵۵ تا ۸۵ درصد برای ژن BRCA1 و ۵۰ تا ۸۵ درصد برای ژن BRCA2 شانس ابتلاء به سرطان پستان را در طول زندگی خود خواهند داشت [۳ - ۸].

در بررسی رشد و پیشرفت سرطان پستان ملکولهایی شناسایی شده اند از جمله RNA های غیر کد کننده ی تحت عنوان MicroRNA ها که در ایجاد سرطان موثر می باشند. برخی از انواع MicroRNA های موجود در سرم و پلاسمای بیماران مبتلا به سرطان پستان از جمله mir-29a نسبت به بقیه افزایش چشمگیری داشته اند [9 - 16]. بیان بیش از اندازه mir-29a در سرطان پستان، پروتئینی را مهار می کند که سبب ناپایداری برخی MicroRNA ها شده و منجر به پیشرفت تومور می شود [17 - 19]. همچنین تهاجم سلول و متاستاز در MCF-7 با ترنسفکت برخی از MicroRNA ها نیز در Invivo مشاهده شده است [۲۰ و ۲۱].

¹Apoptosis

در سرطان پستان ملکولهای دیگری نیز به نام پروتئینهای شوک حرارتی^۲ شناسایی شدند که بیان بالایی داشتند. این پروتئینها در حفظ عملکرد اندامکهای درون سلولی نقش کلیدی ایفا می کنند. برخی عملکردهای این پروتئینها شامل کنترل سیگنالهای سلولی، تاخوردگی پروتئین ها، تنظیم پاسخهای ایمنی و آپتوز می باشند. گرچه این پروتئینها در حالت طبیعی در سلول های نرمال همه موجودات زنده وجود دارند اما با افزایش دما در هنگام بروز تب و یا استرس، با القا پاسخی سریع از سلول حفاظت می کنند. در سلولی که در معرض شوک حرارتی قرار گرفته، پروتئین های وابسته به شوک حرارتی به پروتئین های حساس به حرارت متصل شده و آنها را در مقابل تجزیه محافظت می کنند. برخی از آنها در همراهی با مکانیسم های حفاظتی سلولی مثل سیستم مرگ برنامه ریزی شده از طریق واکنش با اجزاء کلیدی آپوپتوزوم مانند AIF و... از فعالیت کاسپازها^۳ در آپوپتوز جلوگیری می کنند و نقش آنتی آپتوز دارند در حالی که برخی دیگر پروآپتوز می باشند. از این رو در بسیاری سرطانها مثل سرطان پستان میزان بیان آنها بالا است و ارزش پروگنوستیک دارند. [۲۲].

بنابراین با بررسی نقش ملکولهایی همچون MicroRNA ها و HSP ها در سرطان پستان افق های جدیدی به روی ما گشوده شده تا بتوان از آنها جهت درمان سرطان استفاده کرد [۲۳، ۱۱، ۱۳]. با توجه به نقش پروتئین های HSP در پاسخ های استرس سلولی و مقاوم کردن آنها در برابر مرگ سلول و رشد و تکثیر سلولهای توموری در این تحقیق فرض ما براین است که با کاهش بیان mir29a تکثیر سلولهای سرطانی کاهش و آپوپتوز القا می شود و در این بین پروتئین های HSP از هدف های اصلی این اثر آپوپتوزی mir29a می باشد لذا تغییرات بیان HSP های مهمی که در مطالعات قبلی در سرطانها تاکید شده است شامل HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94 و HSP30 را در سلولهای لاین سرطان پستان MCF7، تحت اثر anti-mir29a بررسی می کنیم.

² Heat shock proteins

³ caspase